

PENGEMBANGAN METODE HPTLC-SPEKTROFOTODENSITOMETRI UNTUK PEMISAHAN SENYAWA RIFAMPISIN, ISONIAZID, PIRAZINAMIDA, DAN ETAMIBUTOL

I Putu Hengky Prawiranata¹, Bagus Nyoman Sugiastana¹, I Putu Krisnantara Wijaya Putra¹,
Ni Nyoman Putri Dharmapradnyawati¹, Ida Ayu Alit Widhiartini², I Made Agus Gelgel Wirasuta¹,
I Nyoman Kadjeng Widjaja¹

¹Jurusan Farmasi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

²Bagian Farmasi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

Email: hengky_prawiranata@yahoo.com

ABSTRACT

A simple chromatography separation method for rifampicin, isoniazid, pyrazinamide, and ethambutol by using an impregnated TLC plate with paraffin has been studied. The aim of this study was to develop a simultaneous separation method of rifampicin, isoniazid, pyrazinamide, and ethambutol. TLC silica gel GF₂₅₄ was impregnated with paraffin in diethyl ether 10% (v/v). Plate was activated at 110 °C, 30 minutes. Some variation of mobile phase was used based on a mixture of ethanol and water. The best chromatographic parameters resulting in use a mixture of ethanol:water (95:5 v/v) were added 5% of glacial acetic acid and 1% of diethylamine as mobile phase. Ethambutol can be derivatized by iodine vapor, but it was not detected at a TLC-spectrophotodensitometer, so for a validation only rifampicin, isoniazid, and pyrazinamide. This mobile phase gave good separation with $R_s > 1$ and $\alpha > 1$. The chromatography plates were scanned at 335 nm for rifampicin and at 275 nm for isoniazid and pyrazinamide using a TLC-spectrophotodensitometer. Method validation was included determining the specificity, LOD, and precision of the method. The method developed in this study had good validation. Specificity of method was determined by purity factor value, on this method was obtained of purity factor ($r(s,m)$ and $r(m,e)$) $< 0,99$. The results of this study indicate good precision by intraday and interday assay ($RSD < 20\%$) of the method validation. LOD for rifampicin, isoniazid, and pyrazinamide was 15,339 ng, 29,719 ng, and 26,892 ng respectively. The method developed can be used as a reference for separation of rifampicin, isoniazid, pyrazinamide, and ethambutol in biological or drug samples.

Keywords: Rifampicin, isoniazid, pyrazinamide, ethambutol, impregnation, derivatization

1. PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit menular yang disebabkan oleh infeksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Isoniazid, rifampisin, etambutol, pirazinamida, dan streptomisin merupakan kelompok obat anti tuberkulosis (OAT) primer sebagai standar terapi tuberkulosis (Dirjen Binfar dan Alkes, 2005). Sesuai dengan sifat kuman TB, untuk memperoleh efektifitas pengobatan dan mencegah timbulnya resistensi, maka salah satu prinsip yang digunakan adalah menghindari penggunaan monoterapi. OAT diberikan dalam bentuk kombinasi dari obat isoniazid, rifampisin, etambutol, dan pirazinamida dalam jumlah cukup dan dosis yang tepat sesuai dengan kategori pengobatan.

Dalam upaya memantau efektifitas pengobatan, perlu dilakukan pemeriksaan kadar obat dalam darah yang biasanya disebut dengan kegiatan *Therapeutic Drug Monitoring* (TDM). Untuk itu diperlukan suatu metode awal yang baik dalam memisahkan kombinasi keempat obat tersebut secara simultan didalam plasma darah, yang selanjutnya dapat dilakukan analisis kuantitatif pada keempat OAT tersebut secara simultan (Dirjen Binfar dan Alkes, 2005).

Salah satu metode pemisahan keempat OAT tersebut menggunakan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dengan detektor UV-Visibel. Metode HPLC ini menggunakan fase gerak yang mengandung tetrabutylammonium hidroksida yang dapat

memperpendek usia kolom (Glass *et al.*, 2007). Metode lain yang juga telah dilaporkan untuk memisahkan keempat kombinasi OAT tersebut adalah *High Performance Thin Layer Chromatography* (HPTLC) densitometri fase balik. Pada metode ini digunakan fase diam berupa silika gel 60 RP-18 WF₂₅₄ dan fase gerak campuran pelarut etanol dan air dengan perbandingan (70:30 v/v) yang ditambahkan 5% asam asetat glasial dan 1% amonia 37%. Metode ini telah mampu memisahkan keempat kombinasi OAT tersebut secara simultan dengan baik (Shewiyoa *et al.*, 2012). Plat HPTLC C₁₈ memiliki harga yang relatif mahal dan susah diperoleh di Indonesia. Sanjaya dkk (2012) melaporkan penggunaan plat HPTLC fase normal dengan diimpregnasi terlebih dahulu menggunakan parafin 10% memiliki kinerja yang hampir mirip dengan plat HPTLC C₁₈.

Berdasarkan penelitian tersebut, maka pada penelitian ini dikembangkan metode pemisahan empat OAT primer menggunakan plat *Thin Layer Chromatography* (TLC) fase normal yang impregnasi dengan parafin 10%. Pengembangan metode ini bertujuan untuk mendapatkan metode yang relatif murah dengan validitas yang tinggi.

2. METODE

2.1 Bahan Penelitian

Bahan kimia dan pelarut yang digunakan pada penelitian ini dari *Merck Germany* antara lain: metanol pro analisis (p.a), etanol p.a, propanol p.a, asam asetat glasial p.a, larutan amonia 25% p.a, etil asetat p.a, aseton p.a, kristal iodin p.a, ninhidrin p.a, dietil eter p.a, asetonitril p.a, dan dietilamin p.a serta bahan-bahan lain seperti natrium hidroksida (NaOH), kalium dihidrogen fosfat (KH₂PO₄), minyak parafin teknis (PT Brataco), dan *Water for Irrigation* (WFI). Bahan yang diteliti yaitu senyawa standar rifampisin, isoniazid, pirazinamida, dan etambutol yang diperoleh dari BPOM RI. Fase diam yang digunakan adalah pelat TLC dan HPTLC Silika Gel 60 GF₂₅₄ (*Merck-Germany*).

2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan meliputi alat-alat gelas yang umum dipakai dalam laboratorium analitik, seperti pipet ukur (IWAKI Pyrex),

labu ukur (IWAKI Pyrex), gelas beaker (IWAKI Pyrex), erlenmeyer (IWAKI Pyrex), tabung reaksi, dan vial. Selain itu, juga digunakan tabung mikro (effendorf), pipet mikro, timbangan analitik (AND), ballfiller, oven (Memmert), alat pengaduk mekanik (Ika vibrax VXR basic), alat sentrifugasi dan tabungnya (PLC series), pompa vakum (Gast), pH-meter (Oakton), manifold (Phenomenex), penotol nanomat dan Linomat V, serta TLC-Spektrofotodensitometer (CAMAG-Scanner 3).

2.3 Prosedur

Penyiapan larutan baku kerja, masing-masing senyawa dibuat larutan baku induk dengan konsentrasi 1 mg/mL dalam metanol. Larutan baku kerja dibuat dengan mengencerkan larutan baku induk hingga diperoleh konsentrasi masing-masing senyawa 50 µg/mL.

Impregnasi pelat, pelat TLC silika gel GF₂₅₄ berukuran 7x10 cm sebanyak 4 lembar dicuci dengan metanol dan diaktivasi pada suhu 110°C selama 30 menit. Pelat diimpregnasi dengan parafin 10% (v/v) dalam dietil eter, dan dikeringkan selama 1 jam pada suhu ruangan.

Preparasi sampel, larutan sampel simulasi berupa 400 µL plasma darah manusia yang ditambahkan senyawa standar rifampisin, isoniazid, pirazinamida, dan etambutol dengan konsentrasi masing-masing 50 µg/mL dalam tabung mikro. Selanjutnya ditambahkan dengan 800 µL asetonitril, dicampur dengan pengocok mekanik selama 5 menit dengan kecepatan 1000 rpm. Larutan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 9000 rpm selama 20 menit. Supernatan diambil dan dipindahkan ke tabung mikro yang lain. Supernatan kemudian diuapkan dengan penangas pada suhu 80°C. Ekstrak yang diperoleh direkonstitusi dengan 400 µL metanol dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 9000 rpm selama 10 menit.

Kromatografi, larutan baku kerja masing-masing senyawa dan sampel ditotolkan secara tunggal sebanyak 10 µL (500 ng) pada empat pelat dengan jarak antar totolan 1 cm dan lebar totolan 3,5 mm menggunakan linomat V. Masing-masing pelat dielusi dengan empat fase gerak yang berbeda yaitu :

- Etanol : air (70:30 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% amonia 25%

- b. Etanol : air (80:20 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% amonia 25%
- c. Etanol : air (95:5 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% amonia 25%
- d. Etanol : air (95:5 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% dietilamin

Pelat dimasukkan ke dalam bejana kromatografi yang sebelumnya sudah dijenuhkan dengan fase gerak selama 30 menit, pelat dielusi dengan arah vertikal menggunakan berbagai komposisi fase gerak hingga 9 cm dari tepi bawah pelat. Masing-masing noda pada pelat dipindai dengan spektrofotodensitometer-TLC *Scanner 3* pada panjang gelombang 335 nm untuk rifampisin serta 275 nm untuk isoniazid dan pirazinamida, karena kedua senyawa ini memiliki panjang gelombang maksimum yang berdekatan.

Derivatisasi etambutol menggunakan uap kristal iodin akan menampakkan noda etambutol pada pelat TLC setelah dielusi dengan sistem terpilih.

Analisis pemisahan, fase gerak terbaik dipilih dengan cara membandingkan parameter kromatografi (selektivitas (α) > 1 dan resolusi (R_s) > 1) (Sherma and Fried, 1994).

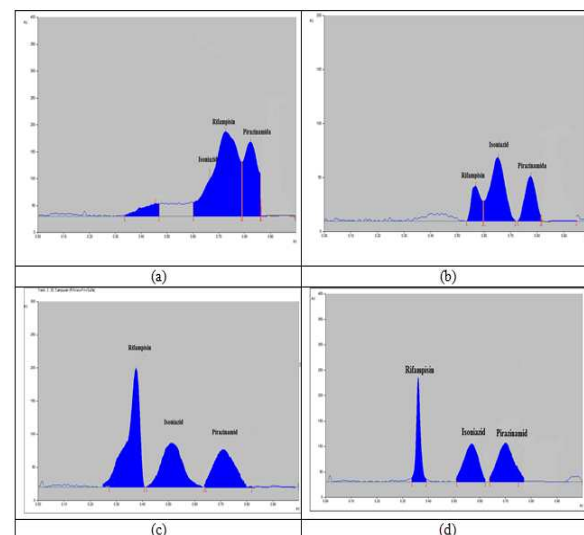
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Derivatisasi Etambutol

Dari keempat senyawa yang digunakan dalam penelitian ini, etambutol merupakan senyawa yang memiliki sedikit gugus kromofor pada rumus strukturnya, hal ini menyebabkan etambutol tidak mampu menyerap radiasi elektromagnetik pada saat dipindai untuk memperoleh kromatogram dan spektrumnya. Adanya derivatisasi etambutol menggunakan reagen ninhidrin atau uap kristal iodin akan menampakkan noda etambutol pada pelat TLC setelah dielusi dengan sistem terpilih, namun masih tetap tidak dapat dipindai dengan spektrofotodensitometer karena derivatisasi yang dilakukan bersifat sementara. Derivatisasi ini hanya berfungsi untuk melihat secara visual di daerah UV 254 nm keterpisahan etambutol dengan senyawa lain yang dipisahkan secara simultan. Reagen terbaik yang dapat digunakan untuk derivatisasi etambutol adalah uap kristal iodin. Selanjutnya untuk validasi metode hanya dapat dilakukan pada senyawa rifampisin, isoniazid, dan pirazinamida saja.

Optimasi Sistem TLC untuk Pemisahan Campuran Rifampisin, Isoniazid, dan Pirazinamida

Hasil pemisahan senyawa rifampisin, isoniazid, dan pirazinamida pada sistem TLC yang dikembangkan pada berbagai fase gerak dengan jarak pengembangan 8 cm dapat dilihat pada profil kromatogram masing-masing senyawa yang ditampilkan pada gambar 3.1.



Gambar 3.1. Profil Kromatogram Campuran Rifampisin, Isoniazid, dan Pirazinamida

Keterangan:

- Fase diam : TLC Silika gel 60 GF₂₅₄ terimpregnasi parafin dalam dietil eter 10% (v/v)
- Fase gerak :
 - (a) etanol : air (70:30 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% amonia 25%;
 - (b) etanol : air (80:20 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% amonia 25%;
 - (c) etanol : air (95:5 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% amonia 25%;
 - (d) etanol : air (95:5 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% dietilamin
- R = Rifampisin; I = Isoniazid; Z = Pirazinamida

Penentuan pemisahan yang baik untuk ketiga senyawa yang dihasilkan dari setiap sistem fase gerak juga dilakukan melalui perhitungan parameter kromatografi seperti resolusi (R_s) dan selektivitas (α). Nilai R_s dan α untuk ketiga senyawa pada setiap fase gerak ditampilkan pada tabel 3.1, 3.2, 3.3, dan 3.4.

Tabel 3.1. Nilai Rs dan α Rifampisin, Isoniazid, dan Pirazinamida pada Fase Gerak Campuran Etanol : air (70:30 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% amonia 25%

Senyawa	Parameter (Rs ; α)		
	Rifampisin	Isoniazid	Pirazinamida
Rifampisin	(0 ; 1)	(0,22 ; 1,24)	(0,44 ; 1,46)
Isoniazid	(0,22 ; 1,24)	(0 ; 1)	(0,65 ; 1,80)
Pirazinamida	(0,44 ; 1,46)	(0,65 ; 1,80)	(0 ; 1)

Tabel 3.2. Nilai Rs dan α Rifampisin, Isoniazid, dan Pirazinamida pada Fase Gerak Campuran Etanol : air (80:20 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% amonia 25%

Senyawa	Parameter (Rs ; α)		
	Rifampisin	Isoniazid	Pirazinamida
Rifampisin	(0 ; 1)	(0,86 ; 1,47)	(2,10 ; 2,68)
Isoniazid	(0,86 ; 1,47)	(0 ; 1)	(0,96 ; 1,83)
Pirazinamida	(2,10 ; 2,68)	(0,96 ; 1,83)	(0 ; 1)

Tabel 3.3. Nilai Rs dan α Rifampisin, Isoniazid, dan Pirazinamida pada Fase Gerak Campuran Etanol : air (95:5 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% amonia 25%

Senyawa	Parameter (Rs ; α)		
	Rifampisin	Isoniazid	Pirazinamida
Rifampisin	(0 ; 1)	(0,76 ; 1,70)	(2,52 ; 4,27)
Isoniazid	(0,76 ; 1,70)	(0 ; 1)	(1,27 ; 2,52)
Pirazinamida	(2,52 ; 4,27)	(1,27 ; 2,52)	(0 ; 1)

Tabel 3.4. Nilai Rs dan α Rifampisin, Isoniazid, dan Pirazinamida pada Fase Gerak Campuran Etanol : air (95:5 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% dietilamin

Senyawa	Parameter (Rs ; α)		
	Rifampisin	Isoniazid	Pirazinamida
Rifampisin	(0 ; 1)	(1,52 ; 2,18)	(2,96 ; 4,13)
Isoniazid	(1,52 ; 2,18)	(0 ; 1)	(1,15 ; 1,90)
Pirazinamida	(2,96 ; 4,13)	(1,15 ; 1,90)	(0 ; 1)

Berdasarkan parameter Rs dan α pada tabel 3.1, 3.2, 3.3, dan 3.4, fase gerak dengan campuran etanol : air (95:5 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% dietilamin menghasilkan pemisahan yang baik untuk ketiga senyawa dibandingkan sistem fase gerak yang lain yaitu dengan nilai Rs lebih besar dari 1 dan nilai α lebih besar dari 1.

Rifampisin pada fase gerak campuran etanol : air (95:5 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% dietilamin selama proses pemisahan berlangsung masih memiliki stabilitas yang baik, dengan tidak terhidrolisis ataupun

teroksidasi. Rifampisin akan mengalami hidrolisis menjadi senyawa 3-formil rifampisin dan 1-amino-4-metil piperazine pada suasana asam ($\text{pH} \leq 4,5$) dan akan mengalami oksidasi menjadi rifampisin kuinon pada suasana basa ($\text{pH} \geq 7,5$) (Melo *et al.*, 2011). Fase gerak campuran etanol : air (95:5 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% dietilamin memiliki pH sebesar 6,85 sehingga rifampisin selama proses pemisahan berlangsung masih memiliki stabilitas yang baik. Gambar kromatogram pemisahan rifampisin, isoniazid, dan pirazinamida dengan fase gerak campuran etanol : air (95:5 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% dietilamin ditampilkan pada kolom (d) gambar 3.1.

Validasi Metode

Spesifisitas (*Specificity*)

Uji spesifisitas bertujuan untuk menentukan kemampuan metode dalam menghasilkan suatu puncak yang hanya mengandung satu senyawa pada keadaan terdapat materi sampel yang lain, seperti pengotor, produk hasil degradasi, matriks, dan lain-lain. Spesifisitas ditentukan dengan menganalisis kemurnian puncak kromatogram masing-masing analit yang diukur pada awal kromatogram (S), pada puncak kromatogram (M), dan pada akhir kromatogram (E). Kemurnian puncak dinyatakan dalam nilai *purity factor*. Uji kemurnian (*purity*) memenuhi persyaratan jika korelasi $r(s,m)$ dan $r(m,e)$ lebih besar dari 0,99. Kemurnian puncak untuk ketiga senyawa ditunjukkan pada tabel 3.5.

Tabel 3.5. Hasil Pemindaian Spektrum Rifampisin, Isoniazid, dan Pirazinamida pada Uji *Purity*

Senyawa	Rf	$r(s,m)$	$r(m,e)$
Rifampisin	0,35	0,99898	0,99691
Isoniazid	0,54	0,99839	0,99770
Pirazinamida	0,69	0,99708	0,99599

Penentuan *Limit of Detection* (LOD)

Setelah diperoleh persamaan regresi linier, dihitung nilai simpangan baku residual dan nilai LOD dari masing-masing analit (rifampisin, isoniazid, dan pirazinamida). LOD Rifampisin = 15,339 ng; Isoniazid = 29,719 ng; dan Pirazinamida = 26,892 ng

Uji Keseksamaan (*precision*)

Uji presisi yang dilakukan adalah *interday* dan *interday* dengan mengukur keterulangan hRf dari 3 seri konsentrasi larutan standar. Uji dilakukan dalam 5 kali pengulangan pada hari yang berbeda. Presisi ditunjukkan dengan nilai KV yang diperoleh dari pengulangan analisis yang dilakukan. Dari data KV presisi hRf secara *intraday* dan *interday* senyawa rifampisin, isoniazid, dan pirazinamida telah memenuhi persyaratan, dimana nilai KV ketiga senyawa tidak melebihi 20%.

4. KESIMPULAN

Metode TLC-Spektrofotodensitometri yang dapat digunakan untuk memisahkan rifampisin, isoniazid, pirazinamida, dan etambutol secara simultan menggunakan fase diam pelat TLC fase normal yang diimpregnasi dengan parafin 10% dalam dietil eter dan fase gerak campuran etanol : air (95:5 v/v) + 5% asam asetat glasial + 1% dietilamin dengan pH 6,85 yang menghasilkan pemisahan dengan nilai resolusi (R_s) > 1 dan selektivitas (α) > 1.

Uji validasi metode memberikan uji kemurnian (*purity*) dengan korelasi > 0,99, nilai LOD masing-masing adalah 15,339 untuk rifampisin, 29,719 ng untuk isoniazid, dan 26,892 ng untuk pirazinamida. Presisi *intraday* dan *interday* rifampisin, isoniazid, dan pirazinamida kurang dari 20%.

5. REFERENSI

- Dirjen Binfar dan Alkes. 2005. *Pharmaceutical Care Untuk Penyakit Tuberkulosis*. Jakarta: Depkes RI.
- Glass, B.D., S. Agatonovic-Kustrin., Y.J. Chen., and M.H. Wisch. 2007. Optimization of a Stability-Indicating HPLC Method for the Simultaneous Determination of Rifampicin, Isoniazid, and Pyrazinamide in a Fixed-Dose Combination using Artificial Neural Networks. *Journal of Chromatographic Science*. 45: 38-44.
- Melo, L.P., R.H.C. Queiroz., and M.E.C. Queiroz. 2011. Automated Determination of Rifampicin in Plasma Samples by in-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled With Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*. 879 (2011): 2454-2458.

- Sanjaya, S.M.T., N.M.P. Susanti., dan I.N.K. Widjaja. 2012. *Pengembangan Metode Kromatografi Lapis Tipis-Spektrofotodensitometri Untuk Analisis Metil-, Etil-, Propil-, dan Butil 4-Hidroksibenzoat Pada Kosmetik* (Skripsi). Denpasar: Universitas Udayana.
- Sherma, J., and B. Fried. 1994. *Handbook of Thin-Layer Chromatography*, Third Edition. New York: Marcel Dekker Inc. (Electronic Version).
- Shewiyoa, D.H., E. Kaale., P.G. Risha., B. Dejaegher., J.S. Verbeke., and Y.V. Heyden. 2012. Optimization of a Reversed-Phase High Performance Thin Layer Chromatography Method for the Separation of Isoniazid, Ethambutol, Rifampicin and Pyrazinamide in Fixed-Dose Combination Antituberculosis Tablets. *Journal of Chromatography A*: 1-7.